

[Handwritten Signature]



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 24 534.7
Anmeldetag: 31. Mai 2002
Anmelder/Inhaber: Dr. med. Jürgen Dödeler,
Oestrich-Winkel/DE
Bezeichnung: Verfahren zum Diagnostizieren des colorektalen
Karzinoms in einer Gewebeprobe und Mittel
zur Behandlung
IPC: C 12 Q, G 01 N, A 61 K

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 20. Juni 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

[Handwritten Signature]

Wehner

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY



Dr. med. Jürgen Dolderer
Rheingaustraße 136
65375 Oestrich-Winkel

Verfahren zum Diagnostizieren des
colorektalen Karzinoms in einer Gewebeprobe und Mittel
zur Behandlung

Beschreibung

Die Erfindung betrifft sowohl ein Verfahren zur Diagnose des colorektalen Karzinoms (Dickdarmkrebs) in einer Gewebeprobe des menschlichen Dick- beziehungsweise des Enddarms als auch ein Mittel zur Behandlung des colorektalen Karzinoms.

Das colorektale Karzinom ist die zweithäufigste Todesursache bei Krebsleiden, welches kontinuierlich in seiner Inzidenz zunimmt und häufig nach einer kurativen chirurgischen Operation wieder auftritt. Colorektale Karzinome (bösartige Dick- und Enddarmtumore) zeigen in den Industrieländern einen kontinuierlichen Anstieg der Inzidenz und stellen bei Männern das zweithäufigste und bei Frauen das dritthäufigste Krebsleiden dar. Es kommen über 200.000 neue Fälle von colorektalen

Karzinomen im Jahr vor, wobei über 100.000 Patienten daran versterben. Das colorektale Karzinom steht somit an zweiter Stelle als Todesursache bei Krebsleidern.

Die Diagnose und Prognose für diese Krebsart wird durch eine Vielzahl von Eigenschaften, die zur Zeit der Erstdiagnose vorhanden sind, beeinflußt. Diese Faktoren beinhalten Alter, Geschlecht, Dauer der Symptome, Zustand der Darmobstruktion, Tumorlokalisierung, Notwendigkeit von Bluttransfusion und die Qualität der chirurgischen Intervention. Bisher haben zwar die Anzahl von Tumoreigenschaften, wie vaskuläre lymphatische Invasivität, Differenzierungsgrad und präoperative Titer von konventionellen Tumormarkern einen prognostischen Wert gezeigt, jedoch gibt es keine geeigneten Marker für die Detektion von Frühstadien des Karzinoms oder für histopathologisch unauffällige Mikrometastasen (minimal residual disease), die der Grund für das Wiederauftreten des Karzinoms, sogar nach kurativer chirurgischer Resektion, sein könnten. Die bisher verwendeten Tumormarker CEA, CK 19 und CK 20 sind für die derzeitige Prognose richtungweisend, jedoch unzuverlässig in der Diagnosedifferenzierung.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine zuverlässige und irrtumsfreie Untersuchungsmethode für das colorektale Karzinom zur Verfügung zu stellen und weiterhin eine wirksame sowie schonende Behandlung des colorektalen Karzinoms aufzuzeigen.

Zur Lösung dieser Aufgabe sieht die Erfindung vor, daß eine Gewebeprobe auf das Vorhandensein von HERG-Kaliumkanälen untersucht wird.

Zur Diagnose wird eine Gewebeprobe des Dick- bzw. Enddarmes im Labor untersucht, wobei der HERG-Kaliumkanal in colorektalen Karzinomzellen exprimiert wird und durch die RT-PCR-Methode nachgewiesen werden kann. Die überraschende und wertvolle Erkenntnis besteht darin, daß der HERG-Kaliumkanal einen hochselektiven funktionellen Tumormarker für das colorektale Karzinom darstellt und somit in der Diagnostik, vor allen zur Erkennung von Frühstadien des Karzinoms und zur Differenzierung zum gesunden colorektalen Gewebe eingesetzt werden kann.

Mitglieder der ether á go-go (EAG) Kaliumkanalfamilie, insbesondere das eag-abhängige (eag-related-gen; ERG) Genprodukt, wie der humane ERG (HERG) Kaliumkanal sind zur Diagnose geeignet. Sie konnten in verschiedenen Tumorzelllinien unterschiedlicher Histiogenese gefunden werden, wobei bekannt ist, daß sie in der Zellproliferation und Transformation eine Rolle spielen.

Die reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (reverse transcriptase polymerase chain reaktion, RT-PCR) ist eine sehr effiziente und hoch sensitive Methode zum Nachweis von minimaler tumor-assozierter mRNA Transkription.

Der HERG (human eag related gene) Kaliumkanal stellt einen besonderen Typ von humanem Kaliumkanal dar, der zu der eag (ether a-go-go) Familie der spannungsaktivierten Kaliumkanäle gehört. In neoplastischen Zellen unterschiedlicher Histiogenese spielt der HERG-

Kaliumkanal offensichtlich eine wichtige, pathophysiologische Rolle in den Regulationsmechanismen und bewirkt ein unlimitiertes Tumorwachstum.

Die gesamte zelluläre RNA-Isolierung wird von den gefrorenen Gewebeproben mit dem Qiagen Rneasy mini-kit nach Anleitung des Herstellers (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Der Gehalt und Reinheit der RNA wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt.

Zur Behandlung von colorektalen Karzinomzellen wird erfindungsgemäß die Verwendung des Antiarrhythmikum E-4031 vorgeschlagen. Dies beruht

auf der wertvollen Erkenntnis, daß der funktionelle HERG-Kaliumkanal, der für die Zellproliferation und das Karzinomwachstum eine wichtige Rolle spielt, selektiv durch das Antiarrhythmikum E-4031 blockiert werden kann. Somit sind neue Ansätze für die Krebstherapie möglich.

Das Antiarrhythmikum E-4031 ist ein

Der Erfindung liegen folgende Untersuchungen und Maßnahmen zugrunde.

Patienten

Es wurden 24 Gewebeproben von 18 verschiedenen Patienten (12 Frauen, 6 Männer; im Alter von 51-86 Jahren, Durchschnittsalter 67,7 Jahre) mit colorektalem Karzinom der UICC Klassifikation von I-IV untersucht. Fünf Karzinome waren im Colon, vier im sigmoidalen Colon und neun im Rektum lokalisiert. Die Gewebeproben wurden von dem umgebenden Gewebe freipräpariert, um eine Überkreuzkontamination zu vermeiden. Für jede einzelne Gewebeprobe wurde ein neues Skalpel benutzt.

Die klinische und histopathologische UICC sowie Dukes Klassifikation von Patienten mit colorektalem Adenokarzinom ergab folgendes:

Stadium (stage) I	- Dukes A	: 3	(pT1 = 1, pT2 = 2)
Stadium (stage) II	- Dukes B	: 5	(pT3 = 5, pT4 = 0) "
Stadium (stage) III	- Dukes C	: 7	(pN1 = 4, pN2 = 3) "
Stadium (stage) IV	- Dukes D	: 3	(pM1 = 3) "

Histopathologisch negative Proben von Colongewebe von 7 Patienten (4 Frauen, 3 Männer; im Alter von 60-68 Jahren, Durchschnittsalter 62,8 Jahre), wovon 3 Proben ein tubullo-villöses Adenom des Colons und 4 Proben eine Sigmadivertikulitis waren, dienten als Negativkontrolle (Schaubild 3).

Die histopathologische Diagnosen, die UICC und Dukes Klassifikation sowie TNM Klassifikation wurden unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Die Gewebeprobe wurde sofort nach der Excision in flüssigen Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C bis zur RNA Extraktion gelagert.

Die colorektale Karzinomzelllinie (Colo-205) wurde für die Detektion der Sensitivität dieser Experimente als positive Kontrolle verwendet.

Reverse Transkription

Die cDNA wurde aus 2µg gesamter RNA in einem Volumen von 20µl Reaktionsmischung synthetisiert, welche 4µl von 5 x Reaktionsbuffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 75 mmol/L KCl und 3 mmol/L MgCl₂), 500 µmol/L dNTP, 100 µmol/L Lösung von poly-dT15-Primer (Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland) und 400 Einheiten von Superscript II (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) enthält. Die Mischung wurde bei 42°C für 60 min inkubiert, für 2 min auf 90°C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt.

Primersequenzen für die RT-PCR Untersuchung:

Folgende Primersequenzen wurden für die anschließenden RT-PCR Untersuchungen verwendet:

Die Primersequenzen für die CEA mRNA waren: A, 5'-TCTGGAACTTCTCCTGGTTCTCTCAGCTGG-3' für die outer sense; B, 5'-TGTAGCTGTTGCAAATGCTTTAAGGAAGAA-3' für die antisense; und C, 5'-GGGCCACTGTCGGCATCATGATTGG-3' für die inner sense cases .

Die Primer für die CK-19 mRNA waren: A, 5'-GTGGAGGTGGATTCCGCTCC-3' für die outer sense; B, 5'-TGGCAATCTCCTGCTCCAG-3' für die outer antisense; C, 5'-ATGGCCGAGCAGAACCGGAA-3' für die inner sense; and D, 5'-CCATGAGCCGCTGGTACTCC-3' für die inner antisense cases.

Die Primer für die CK-20 mRNA waren: A, 5'-GCGTTTATGGGGGTGCTGGAG-3' für die outer sense; B, 5'-AAGGCTCTGGGAGGTGCGTCTC-3' für die outer antisense; C, 5'-CGGCGGGGACCTGTTGT-3' für die inner sense; und D, 5'-CAGTGTTGCCAGATGCTTGTG-3' für die inner antisense cases.

Die Primersequenzen für die HERG mRNA waren:

A, primer up 5'-AGCTGATCGGGCTGCTGAAGACTG -3'.und

B, primer down 5'-AATGAGCATGACGCAGATGGAGAAG-3' .

Um die Integrität der extrahierten RNA zu untersuchen und um sicherzustellen, dass equimolare RNA verwendet wurde, wurde die extrahierte RNA mit Glyceraldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase (GAPDH) mittels RT-PCR kontrolliert. Die Primersequenzen für GAPDH waren: 5'-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3' sense und 5'-TCTAGACGGCAGGTCAAGGTCCACC-3' antisense primers.

Die reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR):

Die zweistufige RT-PCR wurde für die Amplifikation von cDNA von CEA, von CK-19 und CK-20 und von HERG verwendet.

Die PCR wurde wie folgt ausgeführt: Die PCR wurde in einem Volumen von 50 μ l mit 2 μ g der gesamten RNA pro Probe durchgeführt. Für die erste PCR-Runde, 2 μ L Aliquots der cDNA Lösung wurden mit 10,5 μ L der PCR Reaktionsmischung, welche 1,25 μ L 10 x PCR Puffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, und 1.5 mmol/L MgCl₂), 200 μ mol/L dNTP, 0,5 μ mol/L von jedem Primer, und 2,5 Einheiten von Platinum Taq Polymerase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) enthält, gemischt.

Die Reaktion wurde in einem PCR Thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany fortgesetzt. Für die CEA, CK-19 and CK-20 Amplification wurden folgende Bedingungen angewandt: Aktivierung der Taq Polymerase bei 95°C für 4 min, Template Denaturierung bei 95°C für 45 sec, Annealing bei 60°C für 45 sec und Elongation bei 72°C für 45 sec für 20 Zyklen. Die HERG-Amplification wurde bei 95°C, 4 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1 min und 95°C, 1 min für 30 Zyklen durchgeführt.

Zwei Microliter des ersten PCR Produktes wurde in ein zweites Röhrchen transferiert und weiter amplifiziert (CEA, CK-19 und CK-20: bei 95°C, 4 min; 95°C, 45 sec; 60°C, 45 sec und 72°C, 45 sec in 20 Zyklen und HERG bei 95°C, 4 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1 min und 95°C, 1 min in 30

Zyklen). Alle Pipetierarbeiten wurden auf Eis und unter einer sterilen Werkbank durchgeführt und dann die Röhrchen in den Thermocycler gegeben. Zuvor wurden sie auf die Denaturierungstemperatur erhitzt bevor die Amplifikation begann.

Die amplifizierten DNA Fragmente waren 132 Basenpaare (bp) für CEA-, 328 Basenpaare für CK-19-, 485 Basenpaare für CK-20- und 386 Basenpaare für HERG-Primerpaare. Jede Gewebeprobe wurde mindestens zweimal untersucht.

Um die Integrität für cDNA zu überprüfen, wurden in 25 Zyklen die Amplifikation für GAPDH mit 603 Basenpaaren der cDNA Fragmente (95°C, 4min; 95°C, 45 sec; 60°C, 45 sec; 72°C, 45 sec) durchgeführt.

Die PCR Produkte wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Sensitivitätstests der RT-PCR-Methode

Die colorektale Karzinomzelllinie (Colo-205) diente für die Detektionssensitivität in diesen Experimenten als positive Kontrolle. Um die Sensitivität der Methode bestimmen zu können, wurden Verdünnungsreihen von 10^6 bis zu 10^0 der colorektalen Karzinomzellen (Colo-205) angefertigt, denen dann 10^7 Lymphozyten von gesunden Spendern zugegeben wurden. Nach der Extraktion der gesamten RNA wurden die RT-PCR durchgeführt. Die Verdünnungsreihen der RNA zeigten, dass die Primer in der Lage waren eine Menge mRNA, welche equivalent zu einer Tumorzelle in 10^6 Lymphozyten ist, zu detektieren.

Proliferationstest der colorektalen Karzinomzelllinie Colo-205 mit E-4031

Die Proliferationsversuche (Wachstumsversuche) wurden mit dem 3-(4,5-dimethylthiylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolum bromide MTT-Test durchgeführt. Die Zellen der colorektale Karzinomzelllinie Colo 205 wurden mit 0,05%/EDTA geerntet und anschließend ausgezählt. Die Zellen wurden dann in eine 96-Lochplatte (96-well plate) mit je 10^4 lebenden Zellen pro Loch ausgesät und 24 h zum anhaften belassen. Nach 24 h wurde das Medium mit E-4031 in verschiedenen Konzentrationen von 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M ausgetauscht. Das Endvolumen war 200 μ l pro Loch. Nach der Inkubation von 0 bis 7 Tagen wurden 20 μ l MTT (5mg/ml in PBS) hinzugefügt und für 2 h in 37°C Inkubiert. Das Medium wurde dann entfernt und 100 μ l Dimethyl Sulfoxid (Sigma, Deutschland) wurde in jedes Loch für 10 Minuten gegeben.

Ein 96 Loch Mikrotiterplattenleser (Comtek, Germany) wurde für die Auswertung benutzt. Bei einer Wellenlänge von 570 nm Angstrom wurde der MTT-Test in dem ELISA- Mikrotiterplattenleser abgelesen. Die durchschnittliche Konzentration wurde in jedem Set von fünf Löcher gemessen.

Die Absorption der unbehandelten Kontrollen wurden als 100 % angenommen und dementsprechend der IC₅₀ berechnet.

Statistische Auswertung

Ein Unterschied von P<0,05 wurde als signifikant angenommen.

11
ERGEBNISSE

CEA, CK-19 und CK-20 wurden im Karzinom und im Kontrollgewebe sowie in der colorektalen Zelllinie Colo-205 exprimiert. Die HERG Expression war im Gegentell zu 100 % nur auf das Karzinomgewebe und die Colo-205-Zellen beschränkt. Wie im Schaubild 1 und 2 dargestellt, zeigen Gewebeproben, die in der histopathologischen Untersuchung eindeutig ein colorektales Karzinom ergeben, eine Expression von allen Markern (CEA, CK-19, CK-20 und HERG). Colorektales Gewebe von Patienten ohne eine maligne Erkrankung exprimieren auch CEA, CK-19 und/oder CK-20, jedoch ließ sich HERG nie nachweisen (Schaubild 3). Wenn die RT-PCR ohne RT Enzyme durchgeführt wurde, ließen sich in der Zelllinie Colo-205 keine Banden nachweisen, was beweist, dass keine DNA vorhanden ist, und somit die RT-PCR Bedingungen sehr gut abgestimmt sind.

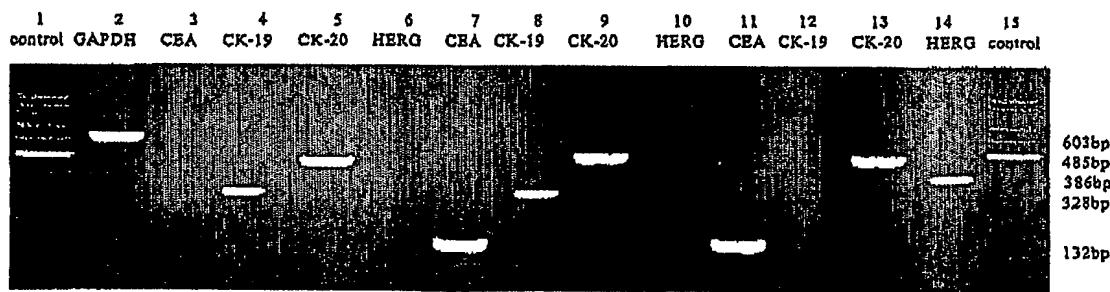


Schaubild 1: RT-PCR zur Darstellung der CEA, CK-19, CK-20 und HERG mRNA Expression in gesundem Colongewebe, in tubulovillösen Colonadenomen und in colorektalen Karzinomen.

In Spalte 1 und 15 sind 100 Basenpaarstufen als Kontrollbanden dargestellt.

In Spalte 2 ist die GAPDH Kontrolle zu sehen, die in allen Proben positiv war. Die Ergebnisse in den Spalten 3 bis 6 sind von einer Gewebeprobe eines Patienten mit Sigmadivertikulitis (Pat. Nr. 6 in Schaubild 3) und in den Spalten 7 bis 10 von einer Gewebeprobe eines Patienten mit einem tubulovillösen Colonadenom (Pat. Nr. 1 in Schaubild 3). Die Banden in den Spalten 11 bis 14 repräsentiert eine Gewebeprobe eines Patienten mit einem colorektalen Karzinom (Pat. Nr. 3 in Schaubild 2).

DNA Fragmente wurden auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Wie in Schaubild 2 zusammengefasst, konnte CEA in 22 (91.7 %), CK-19 in 19 (79.2 %), CK-20 in 23 (95.8 %), und HERG exclusiv zu 100 % in allen der 24 Gewebeproben von colorektalen Karzinomen von 18 verschiedenen untersuchten Patienten nachgewiesen werden.

In allen Proben, außer in der CK-19 und CK-20 Expression im Patienten Nr. 2, waren keine Unterschiede in den mRNA Resultaten der verschiedenen Gewebeproben von dem gleichen Untersuchungspräparat (Patient Nr. 4, 6, 7, 8, 9) vorhanden

Schaubild 2: Detektion von mRNA Expression der Tumormarker CEA, CK-19, CK-20 und HERG mittels RT-PCR in colorektalen Karzinomen

Pat.	GAPDH	CEA	CK-19	CK-20	HERG	Staging - TNM	Lokalisation
1	pos	pos	pos	pos	pos	III - T4,N1(2/10),M0	Sigmoid
2a	pos	pos	neg	neg	pos	III - T3,N1(1/9),M0	Colon
2b	pos	pos	pos	pos	pos		
3	pos	pos	neg	pos	pos	II - T3,N0(0/15),M0	Colon
4a	pos	pos	pos	pos	pos	IV - T3,N2(25/27),M1	Rektum
4b	pos	pos	pos	pos	pos		
5	pos	neg	pos	pos	pos	I - T2,N0(0/6),M0	Sigmoid
6a	pos	pos	pos	pos	pos	IV - T3,N2(11/20),M1	Rektum
6b	pos	pos	pos	pos	pos		
7a	pos	pos	neg	pos	pos	III - T2,N1(2/12),M0	Rektum
7b	pos	pos	neg	pos	pos		
8a	pos	pos	pos	pos	pos	III - T3,N1(1/35),M0	Colon
8b	pos	pos	pos	pos	pos		

9a	pos	pos	pos	pos	pos	III - T3,N2(21/27),M0	Rektum
9b	pos	pos	pos	pos	pos		
10	pos	pos	pos	pos	pos	I - T2,N0(0/10),M0	Rektum
11	pos	pos	pos	pos	pos	II - T3,N0(0/4),M0	Colon
12	pos	pos	pos	pos	pos	IV - T3,N2(6/16),M1	Sigmoid
13	pos	pos	pos	pos	pos	II - T3,N0(0/7),M0	Rektum
14	pos	pos	pos	pos	pos	II - T3,N0(0/13),M0	Colon
15	pos	pos	pos	pos	pos	III - T3,N2(6/11),M0	Rektum
16	pos	pos	pos	pos	pos	I - T1,N0(0/16),M0	Sigmoid
17	pos	pos	pos	pos	pos	III - T3,N2(6/36),M0	Rektum
18	pos	neg	neg	pos	pos	II - T3,N0(0/16),M0	Rektum

Das Grading (histopathologische Differenzierungsgrad) der colorektalen Karzinome war in allen Gewebeproben G 2 ausser für die Probe des Patienten Nr. 1 (G2-3) , Nr. 4 (G3) und Nr. 9 (G2-3).

HERG mRNA wurde in keinem (0 %) der histopathologisch negativen colorektalen Gewebeproben der 3 Patienten mit einem tubulovillösen

Adenom des Colons und der 4 Patienten mit Sigmadivertikulitis, die als Negativkontrollen dienten, nachgewiesen (Schaubild 1 und 3).

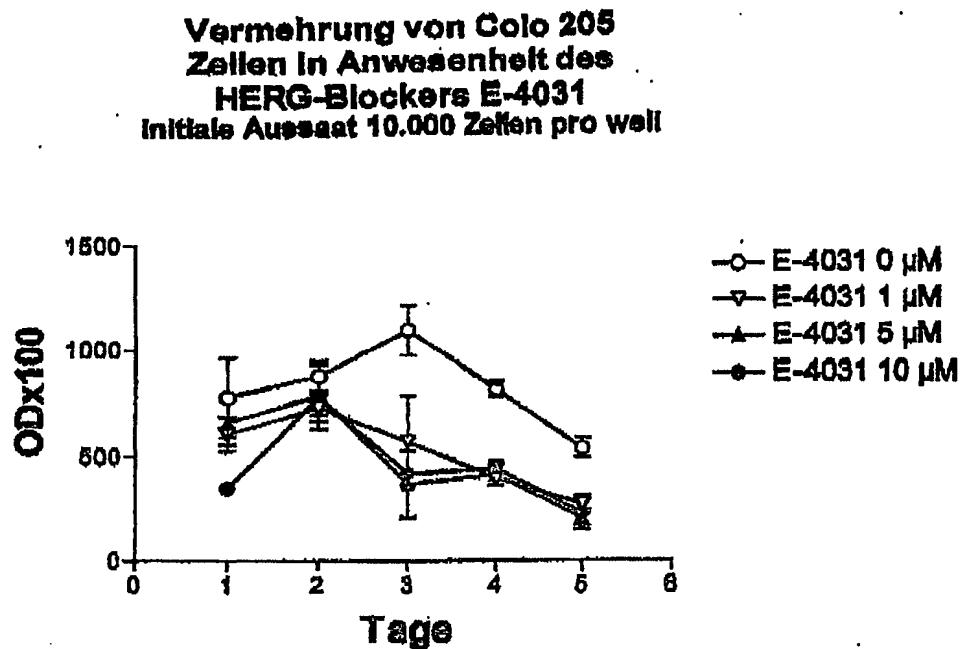
Die mRNA der Tumormarker CEA, CK-19 und CK-20 waren in allen Patienten mit einem Colonadenom positiv (100 %). In den Gewebeproben der Patienten mit Sigmadivertikulitis waren jeweils die mRNA der Marker CEA, CK-19 und CK-20 in 2 Patienten (50 %) positiv.

Schaubild 3: Detektion von mRNA Expression der Tumormarker CEA, CK-19, CK-20 und HERG mittels RT-PCR in histopathologisch negativem colorektalem Gewebe.

Pat. GAPDH CEA CK-19 CK-20 HERG Histologie Lokalisation

1	pos	pos	pos	pos	neg	tubulovillöses Adenom Colon
2	pos	pos	pos	pos	neg	tubulovillöses Adenom Colon
3	pos	pos	pos	pos	neg	tubulovillöses Adenom Colon
4	pos	pos	neg	neg	neg	Sigmadivertikulitis Sigmoid
5	pos	pos	pos	pos	neg	Sigmadivertikulitis Sigmoid
6	pos	neg	pos	pos	neg	Sigmadivertikulitis Sigmoid
7	pos	neg	neg	neg	neg	Sigmadivertikulitis Sigmoid

Schaubild 4: Darstellung der Proliferationshemmung der colorektalen Karzinomzellline Colo-205 durch den selektiven Inhibitor E-4031 des HERG-Kaliumkanals.



E-4031 wurde in 3 verschiedenen Konzentrationen (1, 5 und 10 μ M) zu den Zellen hinzugegeben und dann an 5 darauffolgenden Tagen das Wachstumsverhalten der colorektalen Karzinomzellen gemessen. Die Karzinomzellen wurden durch die Konzentrationen von E-4031 in ihrem Wachstum, durch die Blockierung des für den Karzinomwachstum wichtigen HERG-Kaliumkanal, gehemmt und starben ab.

DISKUSSION

Diese Forschungsarbeit hatte das Ziel, einen Tumormarker zu finden, der verlässlich kanzerogenes von nicht-kanzerogenem colorektalen Gewebe unterscheiden und dadurch detektieren kann und des weiteren karzinogene Tumorzellen in histopathologisch unauffälligem Gewebe nachweisen kann. CEA eignet sich nicht als ein solcher Marker, da CEA mRNA nicht in colorektalen Karzinomen im Stadium I detektiert wurde, aber in allen Gewebeproben der tubulovillösen Colonadenomen und in zwei Proben der Sigmadivertikulitis, die als Negativkontrollen fungierten, exprimiert wird. In Einklang mit den vorgelegten Ergebnissen zeigte Bhatnagar et al. mittels quantitativer Enzymimmunoassay und Immunozytochemie, daß CEA in moderat bis sehr wenig differenzierten colorektalen Tumoren gar nicht vorhanden ist. Boucher et al. demonstriert, daß CEA nicht nur in Adenokarzinomen des Colons, sondern auch in gesundem angrenzendem Schleimhautgewebe des Colons vorkommt.

CK-19 and CK-20 sind nicht nur im Serum, sondern auch im colorektalen Gewebe keine verlässlichen Tumormarker. Sie lassen sich nicht in fortgeschrittenen Karzinomen im Stadium III, jedoch in einigen Kontrollengeweben, nachweisen. Dies bestätigt frühere Beobachtungen,

dass CK-19 und CK-20 auch in gesunder Darmschleimhaut gefunden werden kann, aber auch in einigen Tumoren nicht vorhanden sind. Die Beobachtung, dass das reichliche Vorkommen von CK-19 in gut differenziertem Tumorgewebe und geringgradiger Dysplasie mit geringer Zellproliferation, als auch das geringe Vorkommen in gering differenziertem Karzinomgewebe und hochgradiger Dysplasie mit einer großen Proliferationsrate, sowie die geringe Expression von CK-20 in colorektalen Karzinomen im Vergleich zu gesundem Colongewebe lässt vermuten, dass die negative Tumorprobe des Stadiums III sich in einem hohen Proliferationsstatus befindet. Die konträren Ergebnisse von der Gewebeprobe des Patienten Nr. 2 zeigen zusätzlich, dass die Marker nicht gleichmäßig in dem Tumor verteilt sind.

Im Gegenteil zu den Ergebnissen von CEA, CK-19 und CK-20, war HERG in allen Karzinomen, unabhängig von dem Tumorstadium, vorhanden und in jedem Kontrollgewebe negativ. Daher scheint der HERG-Kaliumkanal ein hochselektiver Tumormarker für das colorektale Gewebe zu sein. Er stellt zudem ein wertvoller Marker für andere epitheliale Karzinome dar, da er auch im Endometriumkarzinom vorkommt. Die vorgelegten Daten unterstützen die kürzlich in *in-vitro* Studien vermutete starke Involvierung der EAG-Kaliumkanäle, den HERG Kaliumkanal miteingeschlossen, in die Karzinogenese. Diese Kali-

umkanäle sind in verschiedenen Tumorzelllinien gefunden worden, die einen transformierten Phänotyp in transfizierten Zellen von Säugetieren übertragen und Tumorprogression in immunsupprimierten Mäusen favorisieren. Da der HERG Kaliumkanal für das Tumorwachstum und/oder das Überleben des Tumors von immenser Bedeutung ist, ließ sich in den Proliferationsstudien nachweisen, dass durch die selektive Blockade des HERG-Kaliumkanals durch E-4031 die Karzinomzellen zum Absterben gelangen. Der HERG-Kaliumkanal, als ein funktioneller Tumormarker für das colorektale Karzinom stellt somit nicht nur einen selektiven Tumormarker dar, sondern ermöglicht auch durch die selektive Hemmung von E-4031 einen neuen Ansatz für die Krebstherapie.

Die überraschenden und wertvollen Erkenntnisse der Erfindung lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß zur Diagnose von colorektalen Karzinomzellen durch HERG-Genexpression ein neuartiger und hochselektiver Marker in Gestalt des HERG-Kaliumkanals Verwendung findet und daß sich das Wachstum der Tumorzellen mit Hilfe der Wirkstoffe des Antiarrhythmikums E-4031 hemmen lässt.

2
28. Mai 2002
LS/ha

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Diagnostizieren des colorektalen Karzinoms in einer Gewebeprobe des menschlichen Dickdarms und/oder Enddarms, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebeprobe auf das Vorhandensein von mindestens einem HERG-Kaliumkanal als Marker diagnostiziert wird.
2. Verwendung des Antiarrhythmikum E-4031 zur Behandlung des colorektalen Karzinoms, wobei das Antiarrhythmikum E-4031 ein

4-[[1-[2-(6-Methyl-2-pyridinyl)ethyl]-4-¹piperidinyl]carbonyl]methanesulfonamid, 2HCl)
ist.

3. Verwendung des Antiarrhythmikum E-4031 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung des colorektalen Karzinoms, wobei das Antiarrhythmikum E-4031 ein

4-[[1-[2-(6-Methyl-2-pyridinyl)ethyl]-4-¹piperidinyl]carbonyl]methanesulfonamid, 2HCl)
ist.

Zusammenfassung

Die überraschenden und wertvollen Erkenntnisse der Erfindung lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß zur Diagnose von colorektalen Karzinomzellen durch HERG-Genexpression ein neuartiger und hochselektiver Marker in Gestalt des HERG-Kaliumkanals Verwendung findet und daß sich das Wachstum der Tumorzellen mit Hilfe der Wirkstoffe des Antiarhythmikums E-4031 hemmen läßt.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.